

## Influence of sweeteners intake in anthocyanins metabolism in humans

## Influencia de la ingesta de edulcorantes en el metabolismo de antocianos en humanos

V. Agulló\*, R. Domínguez-Perles, C. García-Viguera

Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 25, 30100 Espinardo, Murcia. Spain.

\*vagullo@cebas.csic.es

### **Abstract**

In recent decades, a positive relationship has been demonstrated between the consumption of sugary drinks and the risk of obesity, diabetes and cardiovascular diseases. To reduce the sugar content of foods, while maintaining a pleasant taste, new options have been proposed using alternative sweeteners. In this aspect, this study compares stevia, sucralose and sucrose, added to maqui and citrus beverages, in terms of anthocyanin bioavailability in healthy humans after acute administration. Sucralose was the sweetener that provided higher bioavailability for most anthocyanin-derived compounds, followed by stevia, indicating that they can be two good alternatives to the use of sucrose, a high caloric sweetener overused that promotes some metabolic diseases.

**Keywords:** stevia; sucrose; sucralose; anthocyanin; bioavailability.

### **Resumen**

En las últimas décadas se ha encontrado una relación positiva entre el consumo de bebidas azucaradas y el riesgo de padecer obesidad, diabetes y/o enfermedades cardiovasculares. Para reducir el contenido en azúcares de los alimentos, manteniendo un sabor agradable, se han propuesto nuevas opciones usando edulcorantes alternativos con baja carga calórica. En este estudio se estableció una comparativa, en términos de biodisponibilidad de antocianos en humanos sanos tras la ingesta en agudo de una bebida de maqui y cítricos, endulzada con estevia, sucralosa o sacarosa. La sucralosa fue el endulzante que proporcionó una mayor biodisponibilidad para la mayoría de los compuestos derivados de antocianos, seguido de la estevia, indicando que pueden ser dos buenas alternativas al uso de sacarosa, un endulzante calórico que interviene en algunas enfermedades metabólicas.

**Palabras clave:** estevia; sucralosa; sacarosa; antocianos; biodisponibilidad.

## 1. INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos recientes han demostrado una relación positiva entre el consumo de bebidas azucaradas y el riesgo de padecer obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico (1,2). Este tipo de bebidas, elaboradas generalmente con sacarosa y jarabe de fructosa, son fuentes de azúcares rápidamente absorbibles que producen un aumento rápido en plasma de la glucosa y la insulina tras su ingesta, lo que contribuye a producir resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa.

Paralelamente a la búsqueda de alternativas saludables al alto consumo de bebidas azucaradas, existe una necesidad importante de aumentar el consumo de frutas y verduras en la

población y desarrollar nuevas formulaciones que aumenten la vida útil de las frutas frescas, preserven los nutrientes o reduzcan el contenido energético de los zumos de frutas. En este sentido, el limón, por su alto valor nutritivo es una apuesta importante en la elaboración de bebidas no alcohólicas (3). Otro ingrediente novedoso y de atractivas propiedades es el maqui (*Aristotelia chilensis*), una fuente natural especialmente rica en antocianos (derivados de cianidina y delphinidina), que también contiene ácidos hidroxycinámicos (clorogénico) (4). Se ha observado que los antocianos mejoran la hiperglicemia y la sensibilidad a la insulina vía activación de rutas de señalización celular (5).

Con el fin de reducir el contenido en azúcares hay una tendencia a buscar otras opciones a través de edulcorantes alternativos no calóricos, aunque existe cierta polémica ya que parece ser que contribuyen a una mayor ingesta calórica y a la obesidad (6). Para determinar la posible actividad o influencia, de los edulcorantes, sobre la asimilación de fitoquímicos bioactivos, en el presente estudio se empleó uno de tipo natural (estevia), y otra alternativa de tipo sintético (sucralosa) en comparación con sacarosa, para la elaboración de una bebida con base de cítricos y maqui.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Diseño experimental

Se realizó un estudio clínico doble ciego, aleatorizado, cruzado en personas con sobrepeso (n=20). El estudio y el protocolo fueron aprobados por el Comité Ético de Estudios Clínicos (CEIC) oficial del Hospital General Universitario Morales Meseguer (Murcia), y registrados en ClinicalTrials.gov (NCT04016337). Después de una fase inicial de 3 d de lavado con una dieta estricta libre de polifenoles y azúcares añadidos, se administraron 330 mL de las bebidas de prueba (edulcorante con estevia, sucralosa y sacarosa) en ayunas. Se recogieron muestras de orina 24 h antes (tiempo 0), así como en los siguientes intervalos: 0-3,5 h, 3,5-12 h, 12-24 h y fueron inmediatamente congeladas (-80 °C). Después de 15 d, el proceso se repitió nuevamente, para cada voluntario que ingirió otra bebida desarrollada con otro de los edulcorantes, hasta que todas las bebidas fueron consumidas por todos los voluntarios (3 rondas).

### 2.2 Recolección, procesamiento y análisis por UHPLC-ESI-MS/MS de muestras de orina

Las muestras de orina se descongelaron y diluyeron 1:2 (v/v) en agua MilliQ/ácido fórmico (99,9/0,1, v/v) y centrifugaron a 15000 g durante 10 min, a 5 °C (Sigma 1-16, B Braun Biotech International, Osterode, Alemania). Posteriormente, los sobrenadantes se filtraron a través de membranas PVDF de 0,45 µm (Millex HV13, Millipore, Bedford, Mass., EE. UU.) y se almacenaron a -20 °C, hasta el análisis por UHPLC-ESI-MS/MS. La identificación y cuantificación de los metabolitos de antocianos se realizó aplicando el método previamente utilizado por Ludwig et al. con algunas modificaciones (7).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de orina se determinaron 29 metabolitos fenólicos, derivados de antocianos, aunque 11 de ellos se encontraron en un número reducido de voluntarios, por lo que no son representativos. Por tanto, los metabolitos cuantificados fueron aquellos que se identificaron en todos los voluntarios (CA, CA-glucurónido, CA-sulfato, CAT-sulfato, 3,4-DHPAA, DHPAA-glucurónido, DHPAA-sulfato, HA, HA-sulfato, TFA-glucurónido, TFA-sulfato, THBA-glucurónido, THBA-sulfato, TIFA-sulfato, VA, VA-glucurónido, VA-glucurónido-sulfato y VA-sulfato). Curiosamente, no se detectaron las antocianidinas precursoras (Dp y Cy). Este hecho podría atribuirse a la degradación durante la digestión que forma derivados de glucurono, sulfo o metilo

en el tracto gastrointestinal proximal, aunque un mecanismo para la absorción de glicósidos de antocianos todavía es altamente especulativo (8).

En orina, la cuantificación de los metabolitos de antocianos excretados se desarrolló en orina basal (0 h), así como en orina excretada entre 0 y 3,5 h, 3,5-12 h, y 12-24 h. La cinética de excreción para todos los compuestos coincidió en voluntarios que ingirieron los tres tipos de jugos evaluados, presentando la concentración más alta para todos los compuestos identificados a las 3,5 h después de la ingesta de bebidas (Fig. 1). Por esta razón, todas las concentraciones descritas y analizadas estadísticamente se remitieron al marco 0-3,5 h después de la ingestión.

Otro resultado a destacar es que la sucralosa proporcionó una biodisponibilidad mayor para la mayoría de los compuestos (derivados de CA, CAT, THBA y TIFA, DHPAA-sulfato, HA y VA-glucurónido-sulfato), seguido de la estevia (DHPAA, HA-sulfato y VA-sulfato). La sacarosa no proporcionó una biodisponibilidad notablemente superior de ningún compuesto en comparación con los otros dos. Esto puede deberse a que los portadores de azúcar intestinal pueden desempeñar un papel importante en la absorción de flavonoides (9). Un estudio realizado por Mülleder et al. demostró que la adición de sacarosa en los jugos disminuye la excreción total de antocianos (10).

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados indican que la sucralosa es el edulcorante que proporciona una mayor biodisponibilidad para la mayoría de los metabolitos de degradación provenientes de antocianos, por encima de estevia y sacarosa. Sin embargo, hay algunos casos en los que la estevia también tiene una biodisponibilidad significativamente mayor que la sucralosa y la sacarosa. No obstante, la sacarosa no proporciona mayor biodisponibilidad en ningún caso.

Teniendo en cuenta las diferencias en la biodisponibilidad entre los edulcorantes, este estudio propone dos alternativas de edulcorantes no calóricos (sucralosa y estevia) para reducir el consumo de sacarosa, un edulcorante alto en calorías directamente relacionado con algunas enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 y la obesidad.

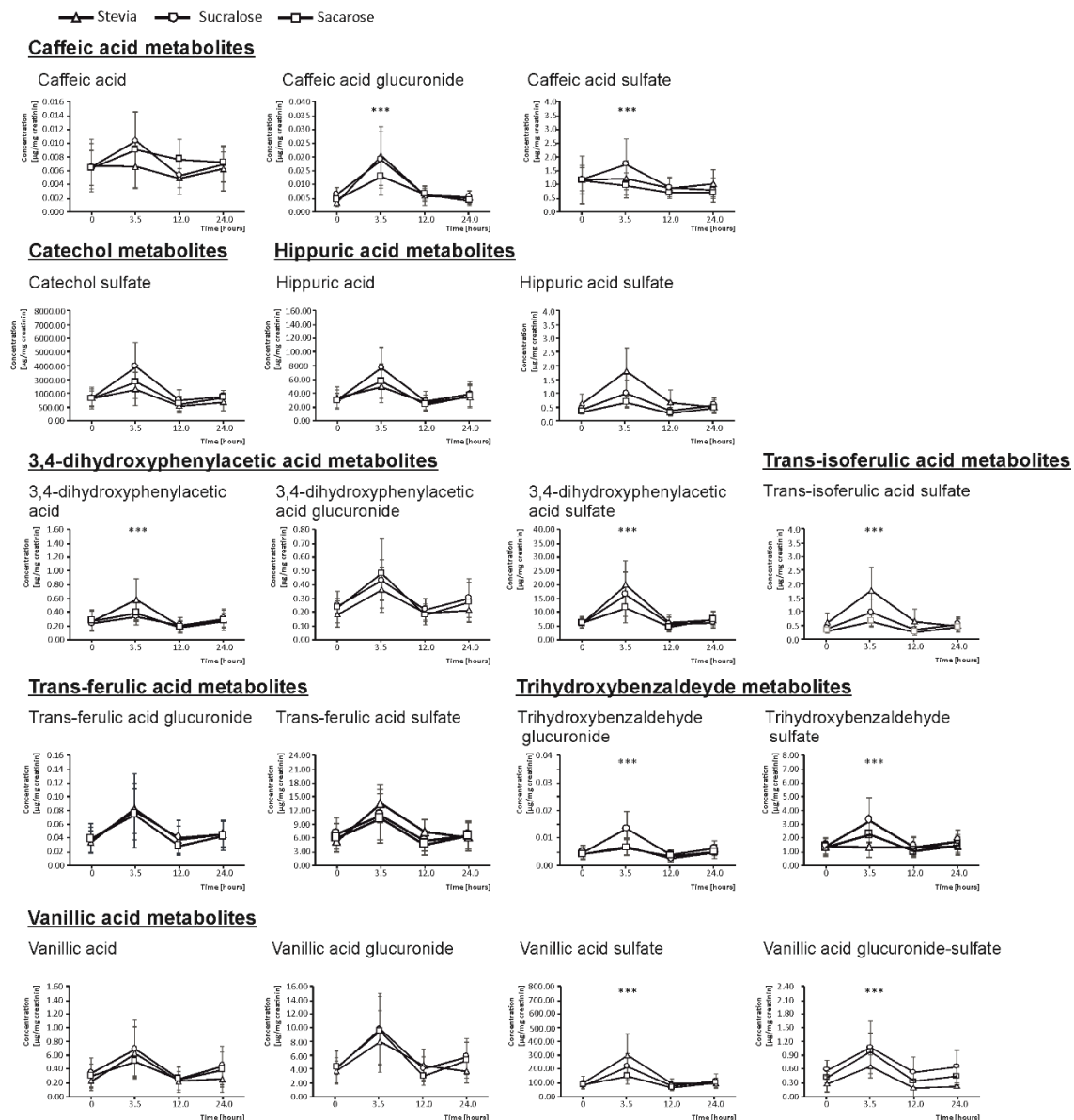
#### 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el MINECO español a través del Proyecto de Investigación AGL2016-75332-C2-1-R, y VA por una subvención del FPI (BES-2017-082424).

#### 6. REFERENCIAS

1. Hu FB, Malik VS. Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiol Behav.* 2010;100:47-54.
2. Popkin BM. Sugary beverages represent a threat to global health. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(12):591-3.
3. Gonzalez-Molina E, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C. Natural bioactive compounds of Citrus lemon for food and health. *NJ Pharm Biomed Anal.* 2010;51:327-45.
4. Gironés-Vilaplana A, Baenas N, Villaño D, Speisky H, Garcia-Viguera C, Moreno DA. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *J Func Foods.* 2014;7:599-608.
5. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci.* 2010;11(4):1365-402.
6. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, Israeli D, Zmora N, Gilad S, Weinberger A, Kuperman Y, Harmelin A, Kolodkin-Gal I, Shapiro H, Halpern Z, Segal E, Elinav E. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature.* 2014;514(7521):181-6.

7. Ludwig IA, Mena P, Calani L, Borges G, Pereira-Caro G, Bresciani L, Del Rio D, Lean ME, Crozier A. New insights into the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:758-69. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.400.
8. Kay CD, Pereira-Caro G, Ludwig IA, Clifford MN, Crozier A. Anthocyanins and Flavanones Are More Bioavailable than Previously Perceived: A Review of Recent Evidence. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2017;8:155-80, doi:10.1146/annurev-food-030216-025636.
9. Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 1995;62:1276-82.
10. Mülleder U, Murkovic M, Pfannhauser W. Urinary excretion of cyanidin glycosides. *J Biochem Bioph Meth.* 2002;53:61-6.



**Figura 1.** Contenido de metabolitos de antocianinas individuales en orina basal y orina de 3,5, 12 y 24 h de voluntarios sanos después de ingerir 330 mL de jugos de maqui-cítricos desarrollados utilizando edulcorantes como estevia ( $\Delta$ ), sucralosa (O) y sacarosa ( $\square$ ). Se encontraron biodisponibilidades significativamente diferentes según un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de rango múltiple de Duncan en  $p < 0,001$  (\*\*\*)